

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“CORRELACIÓN CLÍNICA DEL INCREMENTO DE LA DOSIS GÉNICA DE
VAMP7 CON ALTERACIONES EN LA VIRILIZACIÓN”**

POR:

DRA. SHADAI CHÁVEZ LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA**

DICIEMBRE 2018

**“CORRELACIÓN CLÍNICA DEL INCREMENTO DE LA DOSIS GÉNICA DE
VAMP7 CON ALTERACIONES EN LA VIRILIZACIÓN”**

Aprobación de Tesis:

Dr. med. Luis Daniel Campos Acevedo

Director de Tesis

Dra. Marisol Ibarra Ramírez

Co-Director de Tesis

Dra. med. Laura Elia Martínez de Villarreal

Jefe del Departamento de Genética

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por nunca soltarme de su mano y permitirme llegar al final de esta etapa.

A mis Padres, por su amor y su apoyo incondicional, por recordarme todos los días de lo que puedo ser capaz y de lo lejos que he llegado. Gracias por sus palabras de aliento y su presencia en los momentos más difíciles, así como en los triunfos y alegrías. Por esas largas horas en el teléfono que no permitieron que me sintiera sola, aún estando tan lejos de casa.

Gracias por su confianza, por creer siempre en mis sueños y por impulsarme siempre a seguirlos. Agradezco a Dios por la familia que tengo, sin ustedes no sería quien soy.

A Norma y Oswaldo, por su invaluable apoyo en este proyecto. Gracias por abrirme las puertas de su corazón y ser para mí una segunda familia.

A mis maestros por ser parte vital en mi formación, por fomentar en mí la investigación y ayudarme a llegar al punto en donde me encuentro. Gracias por su ejemplo, por ayudar a forjar la especialista en quien me estoy convirtiendo.

A mis compañeras residentes: Isabel, por sus consejos cuando más los necesité; Ana e Iris por su paciencia, su compañía en los momentos buenos y en los malos y por ser las mejores hermanas mayores; Kia, Caro y Anasofía por su amistad y sus palabras de aliento; a todas ellas, gracias por su cariño, las risas y tantos recuerdos que quedarán guardados por siempre en mi corazón.

Al personal del Departamento de Genética, por su apoyo y trabajo diario. Gracias por hacer de este lugar mi segunda casa.

A todos los involucrados en la realización de este proyecto, gracias por su paciencia, sus consejos y enseñanzas.

CONTENIDO

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Trastornos de la virilización

2.2 Función y expresión de *VAMP7*

2.3 Antecedentes

2.4 Justificación

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de investigación

3.2 Hipótesis nula

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

4.2 Objetivos específicos

CAPÍTULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

5.2 Universo de estudio

5.3 Criterios de inclusión

5.4 Criterios de exclusión

5.5 Criterios de eliminación

5.6 Descripción del diseño

5.6.1 Selección de pacientes

5.6.2 Evaluación clínica

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1 Datos demográficos

6.2 Resultados del análisis molecular

6.3 Resultados de la evaluación clínica

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1 Formato Historia Clínica

9.2 Carta de Aprobación por el Comité de Ética en Investigación

CAÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO XI

11. AUTOBIOGRAFÍA

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA

PÁGINA

1. Resultados de qPCR en sangre en papel filtro	25
2. Datos perinatales de pacientes con dosis génica incrementada de <i>VAMP7</i>	26
3. Datos clínicos de pacientes con dosis génica incrementada de <i>VAMP7</i>	28
4. Correlación de datos clínicos con resultados de qPCR y aCGH en los pacientes con dosis génica incrementada de <i>VAMP7</i>	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA

PÁGINA

1. Trayecto de descenso testicular hacia escroto.....	11
2. Descenso Testicular.....	11
3. Clasificación clínica de hipospadias.....	13
4. Estructura genómica de <i>VAMP7</i>	16
5. Diseño del estudio	23

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

Las alteraciones genitourinarias son de los defectos congénitos más frecuentes en los recién nacidos, sin embargo se sabe poco acerca de su etiología. Los defectos genómicos que comprenden el gen *VAMP7*, están presentes en un subconjunto de pacientes con trastornos genitourinarios congénitos y alteraciones en la dosis génica de este factor, son responsables del desarrollo anormal del tracto genitourinario masculino. En este trabajo se describen las características clínicas de 6 pacientes masculinos en edad preescolar, identificados mediante qPCR, que presentaron dosis génica incrementada de *VAMP7*.

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Trastornos de la virilización

2.1.1 Criptorquidia

Por sus raíces griegas *kryptos* (oculto) y *orkhis* (testículo), la criptorquidia se define como la ausencia de al menos uno de los testículos en el escroto, con ubicación dentro del trayecto normal hacia el mismo.

La criptorquidia puede ser unilateral (en 85% de los casos, más frecuente el derecho) ó bilateral. Se trata de la alteración genital más comúnmente observada en el varón recién nacido, con una prevalencia mundial de 1% a 3% en recién nacidos de término y de 15% a 30% en los varones prematuros. (*Urh K, Kunej T; Lechuga Campoy*)

Los testículos pueden descender al escroto espontáneamente durante el primer año de vida, generalmente en los tres primeros meses de vida en el 75% de los recién nacidos a término y en el 90% de los recién nacidos prematuros; así, la prevalencia de criptorquidia disminuye entre 0,8% y 1,2% en el primer año de vida. (*México: Secretaría de Salud; 2014*)

El desarrollo inicial del testículo se lleva a cabo en la cavidad abdominal a partir de la cresta gonadal desde la sexta semana de vida embrionaria. Las células de Sertoli se desarrollan y forman los cordones testiculares, futuros túbulos seminíferos, y las células de Leydig se ubican en el tejido intersticial. Las células de Sertoli secretan la Hormona Anti-Mülleriana (AMH), que provoca la regresión de los conductos de Müller. Las células de Leydig secretan testosterona que, al unirse al receptor de andrógenos presente en los conductos de Wolff, provoca la diferenciación de éstos en epidídimos, conductos deferentes y vesículas seminales. Por acción de la enzima 5 α -reductasa, la testosterona es transformada en dihidrotestosterona, que se une al receptor de andrógenos en el seno urogenital y en los esbozos de los genitales

externos, dando origen a la próstata y la uretra masculina, y se virilizan los genitales externos. Todos estos procesos tienen lugar en las primeras 12 y 13 semanas del desarrollo fetal. (*Blaschko*)

En la segunda mitad de la gestación, los andrógenos junto con el Factor Insulino-símil 3 (INSL3), también secretado por las células de Leydig en respuesta a la Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) y luego a la Hormona Luteinizante (LH), intervienen en el descenso del testículo y su posición definitiva en el escroto. (Figura 1 y 2).

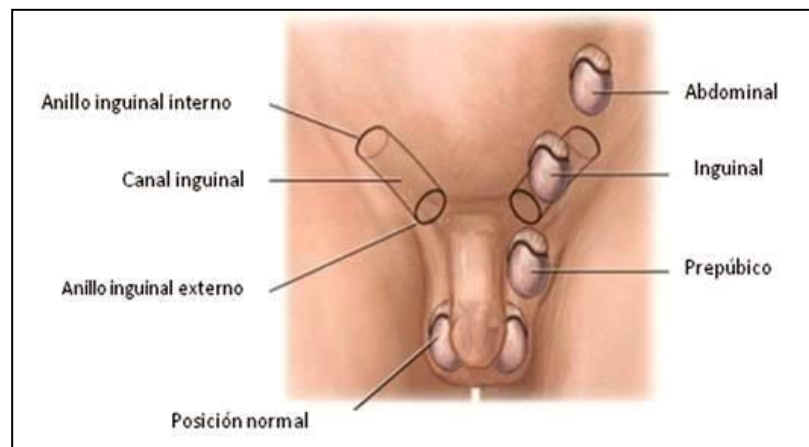


Figura 1. Trayecto de descenso testicular hacia escroto. Tomado de Dr. G. Zamudio. Hipospadias y otros aspectos de la Urología Pediátrica. Uropediatria.com

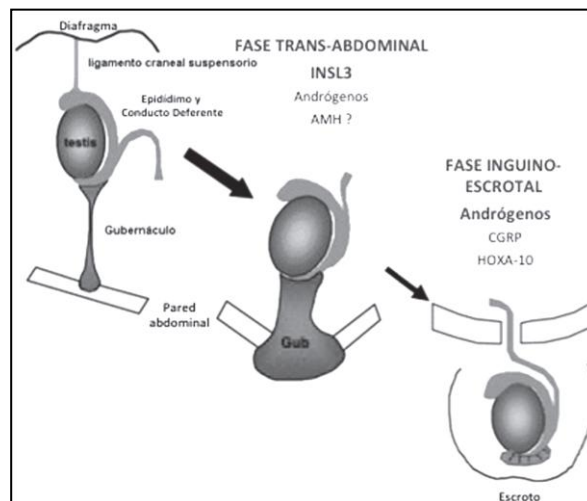


Figura 2. Descenso Testicular. Tomado de Blanco S., Gottlieb S., Grinspon R., Rey R. Criptorquidia: desde la embriología al tratamiento

En la primera fase denominada transabdominal, el testículo está anclado al orificio inguinal interno por medio del *gubernaculum testis*. El factor INSL3, liberado por las células de Leydig, se une a su receptor LGR8 o RFXP2, que se encuentra presente en el *gubernaculum*, lo cual genera un aumento de tamaño del mismo. A su vez, el ligamento suspensorio craneal, que une al testículo con la pared abdominal posterior, entra en regresión por acción de la testosterona. Así, el testículo y epidídimo rodeados de peritoneo se deslizan e ingresan en el conducto inguinal hacia la semana 15 de vida fetal.

En la segunda fase o ínguinoescrotal, el testículo desciende a través del conducto inguinal hasta su posición definitiva en el fondo escrotal, guiado por el *gubernaculum testis*. Este proceso es altamente dependiente de andrógenos, aunque también intervienen otros factores como *CGPR*, *HOXA10* y el aumento de la presión intraabdominal. Esta fase se completa en más del 90% de los fetos hacia la semana 35 de gestación. Una vez que el testículo se ha localizado en la base del escroto, el *gubernaculum* se fibrosa y la conexión peritoneal se cierra.

Tras el nacimiento, el volumen testicular se incrementa levemente. El volumen testicular durante la infancia está representado esencialmente por las células de Sertoli. En la edad puberal, el testículo aumenta notoriamente de tamaño, debido a la proliferación y diferenciación de las células germinales conformando la espermatogénesis puberal y adulta.

El diagnóstico temprano y el manejo del testículo anormalmente descendido son necesarios para prevenir la infertilidad y hacer la detección temprana del cáncer de testículo, ya que se estima que entre 5% a 10% de los testículos no descendidos desarrollan cáncer testicular, y el riesgo relativo para presentar un tumor testicular es de 8 a 10 veces más en hombres con criptorquidia, comparado con la población general (México, Secretaría de Salud. 2014).

2.1.2 Hipospadias

El término hipospadias deriva del griego *hypo* (debajo) y *spadon* (fisura), haciendo referencia al meato uretral. Se trata del segundo defecto congénito más frecuente en varones después de la criptorquidia y la anomalía congénita más frecuente del pene, afectando a 1 de cada 200 a 300 varones. Es un defecto congénito causado por la fusión incompleta de los pliegues uretrales, resultando en un meato uretral localizado más proximal, en cualquier sitio desde el glande hasta el periné (*Pantoja BM; Bouty A.*). La severidad de la hipospadias puede variar de menor a mayor dependiendo de dónde se encuentra la abertura uretral (Figura 3).

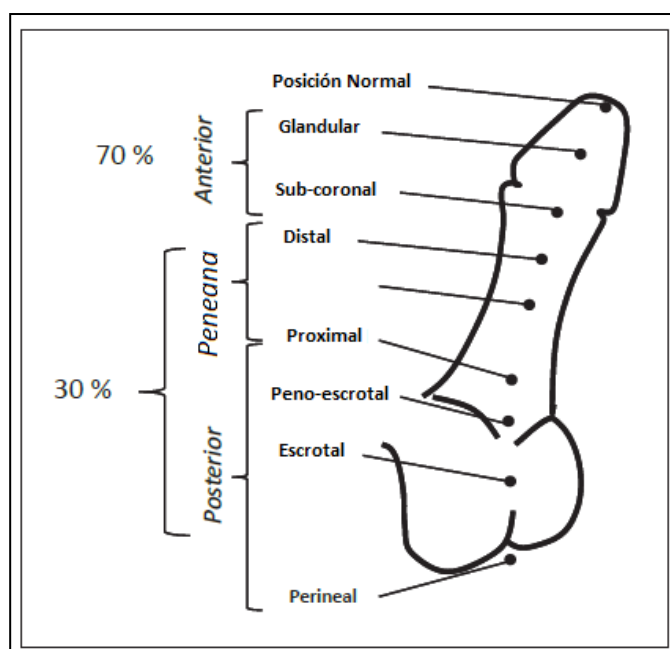


Figura 3. Clasificación clínica de hipospadias. Modificado de Bouty A., Ayers K. L., Pask A., Heloury Y., Sinclair A.H. *The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias.*

La hipospadias generalmente se clasifica dependiendo únicamente de la posición de la abertura uretral en distal (anterior), medio (medio) o proximal (posterior), con algunas subcategorías que definen la posición de la malformación (Figura 3). Las formas anteriores de hipospadias representan el 70% de los casos, mientras los casos mediales y posteriores representan el 30% restante.

En los seres humanos, el desarrollo de los genitales externos ocurre en dos fases: una fase temprana independiente de hormonas (entre las 5 y 8 semanas de gestación) y posteriormente una fase dependiente de hormonas, cuando las gónadas se han diferenciado en testículos en los varones XY (semana 8 a la 12).

Los estrógenos juegan un papel crítico en el desarrollo del pene y el equilibrio en los niveles de andrógenos y estrógenos, es esencial para el desarrollo normal del mismo ya que juegan un papel determinante en el posicionamiento del orificio uretral, la elasticidad del meato uretral y facilita los eventos de fusión epitelial durante la formación de la uretra distal / seno urogenital y del prepucio. Se considera que los niveles reducidos de testosterona, y niveles elevados de estrógenos son un factor de riesgo para hipospadias.

En el último consenso sobre la definición de trastornos del desarrollo sexual (TDS), se incluyó hipospadias como una forma de trastorno del desarrollo 46, XY. Numerosos TDS tienen una causa genética, y varios genes han sido ampliamente implicados en hipospadias; se cree que una combinación de influencias ambientales y susceptibilidad genética causa esta anomalía. Sólo 30% de los casos de hipospadias tienen una causa genética clara.

Diversos variantes en los genes receptores de estrógenos (*ESR1*, *ESR2*) se han reportado en hipospadias. Los factores que afectan el nivel o la actividad de los receptores de estrógeno también pueden desempeñar un papel. En niños con trastornos de masculinización del tracto genitourinario, incluyendo hipospadias, el 1.35% de los casos mostraron una duplicación *de novo* de una región del cromosoma X que contiene el gen *VAMP7*. La expresión de varios genes que responden a los estrógenos, incluyendo *CYR61*, *GADD45β*, *ZEB1* y el factor de transcripción *ATF*, se encuentra incrementado en el prepucio de los pacientes con hipospadias.

Un análisis de expresión génica humana en tejidos del pene con hipospadias y tejidos control, encontró 24 genes que se regulan positivamente. Además de *ATF3* y *CYR61*, los genes estaban implicados en la apoptosis (*FOS*), apoptosis y

señalización (*NR4A1*), metabolismo (*PTGS2*), unión a proteínas (*RTN4*), actividad del receptor (*CD69*), señalización (*DUSP1*, *SOCS3*, *NR4A2*, *EGR1*, *RGS1*, *HBEGF*, *CD9*), transcripción (*FOSB*, *JUN*, *JUNB*, *IER2*, *ZFP36*, *KLF2*, *BTG2*, *HNRNPUL1*), traducción (*EIF4A1*) y actividades del transportador (*SLC25A25*)

El incremento en la incidencia de hipospadias, principalmente en países desarrollados ha llevado a la hipótesis de que la exposición elevada a factores ambientales estrogénicos y antiandrogénicos puede contribuir a su etiología. Diversos productos químicos han sido identificados como tóxicos para el tracto urogenital, como los fitoestrógenos, los micoestrógenos, la epiclorohidrina, la atrazina y los furanos, muchos de ellos teniendo efectos proestrógenos o antiandrogénicos.

Otros factores ambientales posiblemente asociados son: peso bajo al nacimiento, especialmente relacionado con hipospadias proximal; hipertensión materna durante la gestación, preeclampsia, parto pretérmino. Asimismo se ha encontrado un mayor riesgo de hipospadias en madres con sobrepeso y obesidad, atribuido a un mayor nivel de estrógenos circulantes libres o a una mayor cantidad de sustancias químicas almacenadas en el tejido adiposo. En la mayoría de los casos es difícil establecer una asociación directa entre el riesgo de hipospadias y estos factores ya que pueden interferir elementos como el efecto de los antecedentes genéticos o étnicos (*Bouty A.*).

2.2 Función y expresión de *VAMP7*

A partir de una búsqueda de genes expresados en la segunda región pseudoautosómica Xq28 (PAR), en 1996 D'Esposito et al. Identificaron un cDNA de 2.576 pb que codifica un gen similar a la sinaptobrevina, la cual es una proteína integral de membrana de vesículas secretoras. A este gen se le denominó *SYBL1*, y a diferencia de todos los genes pseudoautosómicos localizados en el brazo corto del cromosoma X (Xp) estudiados hasta ese momento, *SYBL1* se inactiva en un cromosoma X de cada célula femenina, y también se encuentra inactivo en el

cromosoma Y (Yq12) de las células masculinas, manteniendo así la compensación de la dosis génica. (OMIM)

VAMP7 (Proteína de membrana asociada a vesículas 7) antes conocido como SYBL1, es un gen conformado por 8 exones (Figura 4) que codifica un polipéptido de 220 aminoácidos de 25 kD, una proteína transmembrana miembro de la familia del receptor soluble de la proteína de unión del factor sensible a N-etilmaleimida (SNARE).

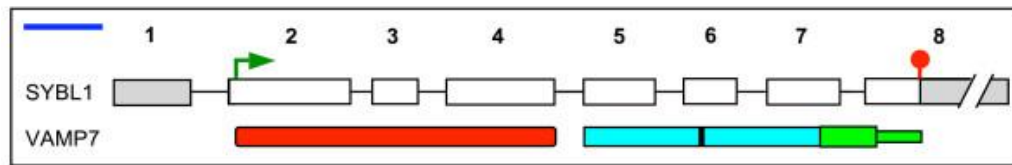


Figura 4. Estructura genómica de VAMP7 (antes SYBL1) y arquitectura del dominio de VAMP7. Arriba: Estructura exón-intrón. Los exones están numerados: las regiones codificantes son blancas y las no codificantes son grises. Codón de inicio (flecha verde) y de detención (círculo rojo). Abajo: arquitectura de dominio de la proteína codificada VAMP7: dominio Longin (rojo), motivo SNARE (azul turquesa, la barra vertical negra indica la arginina conservada de la capa polar) y región transmembrana (verde claro) con cola intravesicular (línea verde más delgada). Tomado de Vacca et al.: *Alternative splicing of the human gene SYBL1 modulates protein domain architecture of longin VAMP7/TIVAMP, showing both non-SNARE and synaptobrevin-like isoforms.*

Esta proteína se encuentra involucrada en varias funciones celulares importantes, incluyendo la fagocitosis, mitosis, migración celular, así como la reparación y el crecimiento de la membrana. Cumple estos roles principalmente a través de la mediación de la fusión de vesículas derivadas del Aparato de Golgi, los endosomas tardíos y lisosomas, con la membrana plasmática. Asimismo se ha identificado la participación de la proteína VAMP7 en el crecimiento neurítico en neuronas en desarrollo, mediante la secreción de tipo constitutivo en las neuronas, una vía relacionada con los lisosomas secretores en células no neuronales; y en la exocitosis de vesículas sinápticas en neuronas maduras (Vacca et al., *The GeneCards*, Tannour-Louet et al.).

La proteína VAMP7 se ha detectado en lisados citoplasmáticos de testículos y ovarios fetales humanos. En la etapa adulta, los niveles de RNAm de VAMP7 se detectan a través del tracto genital masculino humano incluyendo testículos,

epidídimo, vesículas seminales y tejidos prostáticos y penianos; en células de Sertoli, así como en las células germinales de los túbulos seminíferos y en epitelio uretral. Además, el mesénquima genital, incluyendo el cuerpo cavernoso y las espinas penianas andrógeno-dependientes del epitelio prepucial, muestran niveles significativos de proteína VAMP7.

La acción normal de los andrógenos es crucial para el desarrollo del pene y el descenso de los testículos. Un incremento en los niveles de *VAMP7* afectan la función de los receptores de andrógenos, alterando su localización subcelular en el momento de la estimulación dependiente de ligando. Dicha sobreexpresión intensifica la actividad transcripcional del alfa receptor de estrógeno (*ESR1*), aumentando el contenido proteico de ESR1 mediante la estimulación del ligando y sobrerregulando la expresión de genes que responden al estrógeno, los cuales se encuentran implicados en el desarrollo de hipospadias (*Tannour-Louet et al.*).

2.3 Antecedentes

En el año 2012 la Secretaría de Salud Federal lanzó el Programa Piloto de Tamiz Neonatal Ampliado en tres estados de la República, siendo uno de ellos el Estado de Nuevo León. Este programa brindaría a 30,000 recién nacidos en nuestro estado la oportunidad de detectar enfermedades metabólicas utilizando pruebas bioquímicas especializadas siendo posible la detección de hasta 39 enfermedades, cuya sintomatología podría estar presente semanas o incluso años después del nacimiento, generando el riesgo de desarrollar secuelas tan graves como la muerte súbita neonatal o discapacidad intelectual severa. Actualmente diversos países han buscado ampliar el número de enfermedades que pueden ser diagnosticadas a través del uso de muestras de sangre en papel filtro (SPF), tal es el caso de enfermedades de origen genético que pueden ser evaluadas a través de la extracción de DNA de las muestras.

En el Departamento de Genética de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se realizó un estudio piloto donde se utilizaron genes localizados en las regiones pseudoautosómicas (*SHOX*, *VAMP7* y *SRY*) para validar la técnica de Q-PCR en la

detección de aneuploidías. Podemos considerar a ésta técnica como un método cuantitativo, eficaz y económico que puede automatizarse para su aplicación en pruebas de Tamiz y por lo tanto ser costo-efectiva.

Durante la realización de este estudio, se identificaron 8 casos de varones en los que la dosis génica de *VAMP7* se encontraba incrementada, sin estar relacionado con aneuploidías de los cromosomas sexuales. Como se ha mencionado, la expresión de este gen se encuentra en testículos, epidídimo, vesículas seminales, tejidos prostáticos, pene y uretra; motivo por el cual fue seleccionado para correlacionar clínicamente el incremento de la dosis génica de *VAMP7* con trastornos de la virilización.

2.4 Justificación

A pesar de que los defectos genitourinarios son algunos de los defectos congénitos más frecuentes en los recién nacidos, se sabe poco acerca de su etiología. Basados en estudios previos, se busca correlacionar clínicamente el incremento de la dosis génica de *VAMP7* con la presencia de trastornos en la virilización en preescolares.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de investigación

El incremento en la dosis génica del gen *VAMP7* se asocia con alteraciones en la virilización.

3.2 Hipótesis nula

El incremento en la dosis génica del gen *VAMP7* no se asocia con alteraciones en la virilización.

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Correlacionar clínicamente el incremento de la dosis génica de *VAMP7* con la presencia de defectos congénitos del tracto genitourinario atribuibles a trastornos en la virilización.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar, en la base de datos obtenida del protocolo de aneuploidías de los cromosomas sexuales, a los varones que presenten incremento en la dosis génica de *VAMP7*, sin mostrar un perfil de dosis génica compatible con aneuploidías sexuales.
- Citar a la consulta de Genética a dichos individuos, para la realización de historia clínica y exploración física completa.
- Calcular la prevalencia de alteraciones en la virilización, en recién nacidos varones identificados con dosis génica de *VAMP7* incrementada, en una población del noreste del país.

CAPÍTULO V

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Se trata de un estudio

- **Descriptivo** que permitirá observar la prevalencia de trastornos en la virilización en pacientes masculinos con incremento en la dosis génica de *VAMP7*.
- **Transversal** debido a que la evaluación clínica de los individuos se realizó en un periodo comprendido entre Junio de 2017 a Febrero de 2018.

Cuenta con aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (GN17-00001).

5.2 Universo de estudio

Se consideraron 8 preescolares varones, con incremento de la dosis génica de *VAMP7*, quienes participaron previamente del protocolo de investigación de Aneuploidías Sexuales. Dichos pacientes fueron evaluados clínicamente mediante historia clínica y exploración física completa para identificar trastornos en la virilización.

5.3 Criterios de inclusión

- Preescolares masculinos que presenten incremento en la dosis génica (>1.3 RQ) del gen *VAMP7*, sin mostrar un perfil de dosis génica compatible con aneuploidías sexuales.

5.4 Criterios de exclusión

- Preescolares masculinos que presentaran un perfil de dosis génica compatible con aneuploidías sexuales e incremento en la dosis génica del gen *VAMP7*.

5.5 Criterios de eliminación

- Rechazo de los tutores a realizar evaluación clínica completa.
- Incapacidad de localizar al sujeto (Cambio de número telefónico, cambio de domicilio)

5.6 Descripción del diseño

El estudio contempla la evaluación clínica completa, con búsqueda intencionada de trastornos en la virilización, de pacientes masculinos con incremento en la dosis génica de *VAMP7*; para correlacionar clínicamente.

5.6.1 Selección de pacientes

Los pacientes fueron seleccionados de una base de datos que incluye varones entre 2 y 4 años de edad, quienes previamente participaron en un protocolo de investigación donde se realizó la cuantificación de la dosis génica de *VAMP7* por qPCR en muestras de sangre en papel filtro, y que presentaron un incremento de >1.3 RQ. Se identificaron 8 pacientes masculinos con dosis génica incrementada de *VAMP7*, a quienes se localizaron vía telefónica o mediante visita domiciliaria explicando el objetivo del protocolo de estudio e invitándolos a participar en el mismo.

5.6.2 Evaluación clínica

Una vez que los tutores aceptaron su participación en el estudio, se procedió a citarlos para una evaluación en el Departamento de Genética de Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” donde se realizó una historia clínica, árbol genealógico y exploración física con somatometría, realizando una búsqueda intencionada de trastornos en la virilización como criptorquidia e hipospadias. A través de dicha evaluación, se pudieron identificar además casos de trastornos en el neurodesarrollo, así como trastornos alérgicos por lo que pudieron ser referidos a los servicios correspondientes para su manejo y seguimiento.

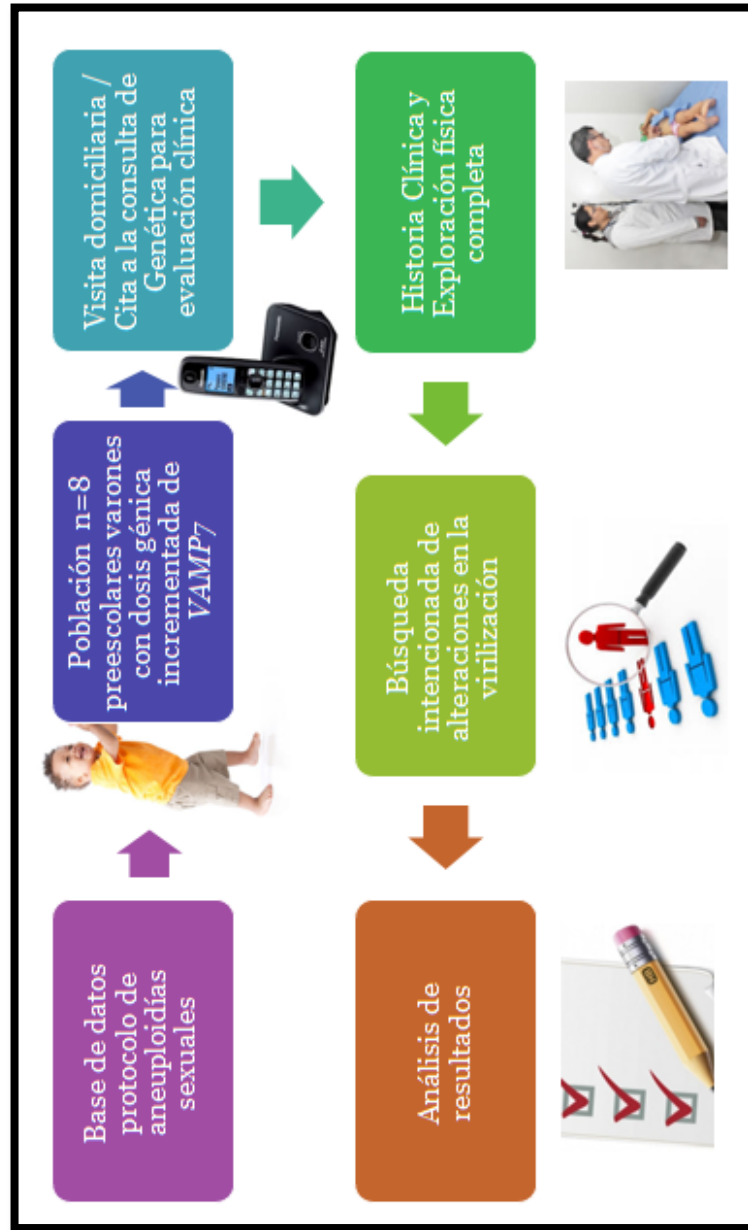


Figura 5. Diseño del estudio

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1 Datos demográficos

Este protocolo de tesis tiene como antecedente un proyecto previo titulado “Detección temprana de las aneuploidías de cromosomas sexuales a través de la cuantificación de la dosis génica por q-PCR en muestras de sangre en papel filtro para tamiz neonatal ampliado” con registro de comité de ética GN13-002, el cual inició la recolección de las muestras desde el 1 de mayo de 2014 y finalizó el 31 de enero de 2016. En este periodo se recolectaron 10,033 muestras en papel filtro de sangre del talón de neonatos nacidos en los servicios de salud del Estado de Nuevo León. De acuerdo con el género asignado al nacimiento, 4,945 fueron de sujetos de sexo femenino (49.28%) y 5,088 sujetos fueron de sexo masculino (50.71%).

6.2 Resultados del análisis molecular

qPCR

Los ensayos de cuantificación del número de copias de los genes *SHOX*, *VAMP7* y *SRY*, se realizaron usando Sondas TaqMan siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los genes fueron etiquetados con el fluoróforo 6-FAM, mientras que el gen de referencia (RNaseP) se marcó con VIC (Nº de catálogo 4403328).

La PCR en Tiempo Real fue realizada usando un termociclador StepOne-plus (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR se llevó a cabo con 4 µL de TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.5 µL de cada sonda TaqMan (20x), 0.5 µL de la sonda del gen de referencia (20x), y 5 µL a 10 ng / µL de DNAg a un volumen final de 10 µL en una placa de reacción MicroAmp Fast Optical de 96 pocillos. La amplificación se llevó a cabo bajo las

siguientes condiciones: 95 ° C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos a 95 ° C durante 20 s y 60 ° C durante 1 min. Para la normalización, el control interno gen RNaseP se amplificó en paralelo en el mismo pozo con el gen objetivo en condiciones idénticas y ciclismo. Los valores de cuantificación relativa (RQ) se obtuvieron usando el método delta-delta CT ($\Delta\Delta CT$). Se consideraron valores >1.3 como ganancia y <0.7 como pérdida.

El coeficiente de correlación entre la CT y la concentración de DNA de plantilla para cada ensayo TaqMan se calculó mediante análisis de regresión y eficiencia de amplificación usando la siguiente fórmula: Eficiencia = $-1 + 10^{(-1 / \text{pendiente})}$. De acuerdo a estos valores, se pudieron identificar 8 individuos varones con incremento en la dosis génica de *VAMP7* mediante qPCR en sangre en papel filtro (SPF). (Tabla 1)

Paciente	RQ		
	<i>SHOX</i>	<i>VAMP7</i>	<i>SRY</i>
1	1.17	1.40	0.70
2	1.11	1.44	1.04
3	1.07	1.44	0.91
4	1.05	1.79	1.04
5	0.93	1.39	0.99
6	1.09	1.38	1.06
7	0.93	1.45	0.98
8	0.8	1.35	1.07

Tabla 1. Resultados de qPCR en sangre en papel filtro. Se muestra la dosis génica de cada paciente obtenido en un análisis por duplicado. Se evidencia únicamente el incremento de la dosis génica de *VAMP7*.

Microarreglos de CGH (aCGH)

El aCGH se realizó utilizando las micromatrices CGH humanas SurePrint G3 4 × 180 K (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se fragmentaron 250ng de DNA genómico de cada muestra y controles de referencia humano correspondiente al sexo de las muestras mediante a mediante reacción enzimática. Los DNA fragmentados se marcaron con Cy3 (DNA de

referencia) y Cy5 (muestras de prueba) dUTP fluorescente, respectivamente, utilizando el kit SureTag DNA Complete Labeling (Agilent Technologies). Se usaron columnas de purificación (Agilent) para eliminar los nucleótidos y colorantes no incorporados. Las muestras marcadas junto con el DNA de Cot-1 humano se agregaron juntas y se hibridaron en los portaobjetos de matriz. Las hibridaciones de DNA marcados a los arreglos de CGH humanas SurePrint G3 (4 x 180 K) (Agilent Technologies) se realizaron en un horno de hibridación a 67°C a 20 rpm durante 24 horas. Los arreglos fueron escaneados con el equipo SureScan Microarray de Agilent (Agilent Technologies). Se utilizó el software Agilent CytoGenomics (Agilent Technologies) para visualizar, detectar y analizar los cambios cromosómicos dentro de los cromosomas X y Y.

6.3 Resultados de la evaluación clínica

Los pacientes con dosis génica incrementada de *VAMP7* fueron 8, de los cuales 6 pudieron ser localizados para realizar evaluación clínica completa (Paciente 1, 2, 3, 4, 5, 7) y dos de los pacientes no pudieron ser localizados por lo que no concluyeron el estudio (Pacientes 6 y 8).

Se recabaron los datos perinatales de los pacientes con el incremento de la dosis génica de *VAMP7*. (Tabla 2)

Caso	Edad materna (años)	Edad paterna (años)	Paridad	Control prenatal	Capurro (sdg)	Peso (g)	Talla (cm)	PC (cm)	Apgar
1	30	30	G3 P0 C2 A1	Diabetes gestacional	37.4	3100	51	34	8/9
2	32	38	G2 P2	Preeclampsia	39.4	3800	50	36	9/9
3	21	25	G3 P3	APP 8° mes	36.3	2000	45	31	9/9
4	20	22	G2 P2	Normal	39	3480	51	34	8/9
5	33	33	G6 P5 C0 A1	Normal	40	3920	53	37	8/9
6	30	NC	G4 P3 C0 A1	Normal	39.2	3100	53	NC	NC
7	23	26	G2 P2	APP 8° mes	38.3	3430	51	NC	NC
8	22	NC	G3 P2 C0 A1	Normal	38.2	2810	50	32.5	8/9

Tabla 2. Datos perinatales de los pacientes con dosis génica incrementada de *VAMP7*. SDG: Semanas de gestación. PC: Perímetro cefálico. APP: Amenaza de parto pretérmino. NC: No consignado.

La evaluación clínica se llevó a con árbol genealógico, historia clínica y exploración física completa con somatometría. (Tabla 3).

Caso 1. Masculino de 3 años de edad, producto de la tercera gesta de madre y padre de 30 años de edad, no consanguíneos y aparentemente sanos. Nace a las 37.4 sdg vía cesárea por falta de progresión de trabajo de parto, Apgar 8/9. Presenta retraso del desarrollo del lenguaje, con inicio de monosílabos y frases a partir de los 2 años, el desarrollo motor es adecuado. A la exploración física se encontró con peso de 16kg (p90), talla 92cm (p10-25) y perímetro cefálico (PC) 48.7cm (p10). Criptorquidia inguinal bilateral y pene de 4cm de longitud (p10).

Caso 2. Masculino de 2 años 3 meses de edad, producto de la segunda gesta de madre de 32 años y padre de 38 años de edad, no consanguíneos y aparentemente sanos. Nace a las 39.4 sdg vía parto eutócico, Apgar 9/9. Presencia de retraso del desarrollo del lenguaje, con inicio de monosílabos y frases a partir del año 7 meses de edad, así como retraso en la dentición, que inició al año 2 meses. El desarrollo motor se refirió como adecuado. A la exploración física se encontró con peso de 11kg (p3), talla 87.5cm (p25) y PC 47cm (p3). Criptorquidia inguinal unilateral derecha, pene de 3cm de longitud (p10) e hipospadias glandular.

Caso 3. Masculino de 3 años 1 mes de edad, producto de la tercera gesta de madre de 21 años y padre de 25 años de edad, no consanguíneos y aparentemente sanos. Presenta medio hermano con antecedente de retraso psicomotor. Nace a las 36.3 sdg vía parto eutócico, Apgar 9/9. Presencia de retraso del desarrollo del lenguaje, aún sin formar frases cortas; el desarrollo motor fue adecuado. A la exploración física se encontró con peso de 11.500kg (-2DS), talla 87cm (-2.5DS) y PC 46cm (-3.7 DS). Bolsa escrotal hipoplásica, criptorquidia prescrotal bilateral, pene de 4cm de longitud (p10).

Caso 4. Masculino de 3 años 5 meses de edad, producto de la segunda gesta de madre de 20 años y padre de 22 años de edad, no consanguíneos y aparentemente sanos. Nace a las 39 sdg vía parto eutócico, con Apgar 8/9. Los hitos del desarrollo fueron adecuados. Presenta cuadros de rinitis alérgica y dermatitis atópica. A la exploración física se encontró con peso de 14.500kg (p42), talla 93cm (p14) y PC 48.5cm (p10). Genitales masculinos sin alteraciones, pene de 4.5cm de longitud (p25).

Caso 5. Masculino de 3 años de edad, producto de la sexta gesta de madre y padre de 33 años de edad, no consanguíneos y aparentemente sanos. Nace a las 40 sdg vía parto eutócico con Apgar 9/9. Adecuados hitos del desarrollo. Cuadros de dermatitis atópica y diagnóstico de asma. A la exploración física se encontró con peso de 14kg (p41), talla 94cm (p19) y PC 49.5cm (p25). Genitales masculinos, sin alteraciones, pene de 4 cm de longitud (p10).

Caso 6. Masculino de 3 años 8 meses de edad, producto de la segunda gesta de madre de 23 años y padre de 26 años de edad, no consanguíneos y aparentemente sanos. Nace a las 38.4 sdg vía parto eutócico, se obtuvo producto único vivo masculino que lloró al nacer, se desconoce Apgar. Adecuados hitos del desarrollo. Alérgico a las proteínas de la leche de vaca. A la exploración física se encontró con peso de 15kg (p34), talla 100cm (p46) y PC 51cm (p50). Genitales masculinos, sin alteraciones, pene de 4cm de longitud (p10).

Caso	Edad (a, m)	Peso (Kg)	Talla (cm)	PC (cm)	Desarrollo del lenguaje	Criptorquidia	Hipospadias	Reacciones alérgicas
1	3a	16	92	48.7	Retraso	CIB	No	No
2	2a 3m	11	87.5	47	Retraso	CIUD	Glandular	No
3	3a 1m	11.5	87	46	Retraso	CPB	No	No
4	3a 5m	14.5	93	48.5	NL	No	No	RA DA
5	3a	14	94	49.5	NL	No	No	DA AS
6	3a 8m	15	100	51	NL	No	No	AP

Tabla 3. Datos clínicos de los pacientes con dosis génica incrementada de VAMP7. CIB: Criptorquidia inguinal bilateral. CIUD: Criptorquidia inguinal unilateral derecha. CPB: Criptorquidia prescrotal bilateral. NL: Normal. RA: Rinitis alérgica. DA: Dermatitis atópica. AS: Asma. AP: Alergia a las proteínas de la leche.

6.4 Resultados qPCR en sangre periférica

Posterior a la evaluación clínica, se realizó una segunda cuantificación por PCR de *VAMP7* en sangre periférica. En dos de los casos (Caso 1 con criptorquidia inguinal bilateral y retraso del desarrollo del lenguaje y caso 5 con dermatitis atópica y asma) el resultado de qPCR fue normal.

6.5 aCGH

En la Tabla 4 se presenta la correlación entre el análisis por qPCR y microarreglos con los datos clínicos de los pacientes.

Paciente	Manifestaciones Clínicas	Dosis génica de <i>VAMP7</i> por qPCR (SPF)	Dosis génica de <i>VAMP7</i> por qPCR (SP)	Posición Genómica	Ganancia en el número de copias (kb) por aCGH	Genes involucrados
1	CIB, RL	1.4	1	-	SG	Ninguno
2	CIUD, HG, RL	1.44	1.83	ChrX:154947945-155232877	284.933	<i>SPRY3</i> , <i>VAMP7</i> , <i>IL9R</i>
3	CPB, RL	1.44	1.83	ChrX:154947945-155232877	284.933	<i>SPRY3</i> , <i>VAMP7</i> , <i>IL9R</i>
4	RA/DA	1.79	1.68	ChrX:154931044-155185493	254.449	<i>SPRY3</i> , <i>VAMP7</i>
5	DA/AS	1.39	0.99	-	SG	Ninguno
6	AP	1.45	1.94	ChrX:154947945-155232877	284.933	<i>SPRY3</i> , <i>VAMP7</i> , <i>IL9R</i>

Tabla 4. Correlación de datos clínicos con resultados de qPCR ($RQ > 1.3$) y Microarreglos de CGH en los pacientes con dosis génica incrementada de *VAMP7*. SPF: Sangre en papel filtro. SP: Sangre periférica. CIB: Criptorquidia inguinal bilateral. CIUD: Criptorquidia inguinal unilateral derecha. CPB: Criptorquidia prescrotal bilateral. R.L: Retraso del Lenguaje. RA: Rinitis alérgica. DA: Dermatitis atópica. AS: Asma. AP: Alergia a las proteínas de la leche. SG: Sin Ganancia.

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

La etiología de las malformaciones congénitas del tracto genitourinario aun no ha sido dilucidada. Se piensa que pueden ser debidos a causas monogénicas o multifactorial. De acuerdo a un meta-análisis realizado por van der Zanden LF y cols., algunos autores han propuesto mutaciones en genes tales como: *WT1*, *SF1*, *BMP4*, *BMP7*, *HOXA4*, *HOXB6*, *FGF8*, *FGFR2*, *AR*, *HSD3B2*, *SRD5A2*, *ATF3*, *MAMLD1*, *MID1* y *BNC2* sin embargo, para algunos autores, las mutaciones en genes únicos no causan la mayoría de las hipospadias aisladas, por lo que también se han descrito variantes polimórficas en genes como *FGF8*, *FGFR2*, *AR*, *HSD17B3*, *SRD5A2*, *ESR1*, *ESR2*, *ATF3*, *MAMLD1*, *DGKK*, *MID1*, *CYP11A1*, *GSTM1* y *GSTT1*, como riesgo para hipospadias. También mediante estudios de expresión se han identificados algunos otros genes candidatos como: *CTGF*, *CYR61* and *EGF*. (van Der Zanden LF)

Recientemente, se han publicado reportes donde asocian el incremento de la dosis génica de *VAMP7* con trastornos de la virilización. En 2014 Tannour-Louet et. al, analizaron 116 casos de varones con trastornos de la diferenciación sexual incluyendo alteraciones en el descenso testicular así como defectos en la morfología del pene. Mediante análisis de aCGH pudieron identificar 2 sujetos (1.7%) con una ganancia idéntica en el número de copias en la región Xq28, específicamente *VAMP7*. Basados en estas observaciones, se postuló que la duplicación de la región Xq28, específicamente de *VAMP7*, juega un papel en los trastornos humanos de la masculinización del tracto urogenital. En una cohorte distinta de 180 individuos con manifestaciones clínicas similares fue evaluada y se reportaron 2 sujetos (1.1%) con ganancia en el número de copias en *VAMP7*, esta vez mediante la técnica qPCR. En ambos estudios la selección de los sujetos partió de las manifestaciones clínicas, específicamente de la presencia de trastornos de la virilización como criptorquidia e hipospadias, para posteriormente analizar la dosis génica de *VAMP7* (Tannour-Louet et al., De Bonis).

En el presente trabajo, a diferencia de los previamente mencionados, los casos fueron seleccionados inicialmente al presentar una dosis génica incrementada de *VAMP7* en un estudio para la detección temprana de aneuploidías de cromosomas sexuales mediante qPCR en SPF. Este análisis mostró que 8/10,033 individuos tenían una dosis aumentada del gen *VAMP7*. Se evaluaron clínicamente seis pacientes, de los cuales tres (50%) se identificaron con alteraciones en el desarrollo genital (2 criptorquidia bilateral y 1 criptorquidia unilateral e hipospadias glandulares) y retraso del habla, mientras que el resto presentó diferentes tipos de atopia.

Considerando los estudios previos, en los cuales se encontró asociación de incremento de dosis génica de *VAMP7* con alteraciones en el desarrollo genito urinario en alrededor del 1.3% de los individuos analizados, en nuestro estudio, mediante la búsqueda de casos, a partir de la dosis incrementada del gen (>1.3 RQ), se logró la identificación de esta asociación, soportando así lo reportado por otros autores (*Wang Z*). Es interesante que los pacientes identificados con alteraciones en la expresión de *VAMP7* son similares a los reportados por Tannour-Louet et. al. En relación a la incidencia esperada de trastornos de virilización, encontramos 1.97% para la criptorquidia y 1.96% para las hipospadias. Por otro lado, tres de los casos que no presentaron malformaciones genitourinarias coincidieron en presentar diferentes tipos de atopia.

Después de realizar una segunda qPCR en sangre periférica y aCGH, el aumento en la dosis del gen *VAMP7* se confirmó en 4 de los 6 casos, excluyendo dos que inicialmente fueron identificados como genes de dosis altas por la qPCR en SPF, considerando estos resultados como falsos positivos.

Se ha sugerido la participación de la proteína VAMP7 en el crecimiento neurítico de neuronas en desarrollo ha sido reportada, lo que podría explicar las alteraciones en el lenguaje que presentaron los pacientes. Aunque no hay estudios que evidencien fehacientemente su relación con el desarrollo genito urinario los resultados

obtenidos en nuestro estudio, así como los previamente reportados, sugieren fuertemente un papel de este gen en el desarrollo de estos defectos.

En la región identificada mediante el estudio de aCGH (Xq28-Xqter) también se encuentran los genes *IL9R* y *SPRY3*, los cuáles pudieran correlacionarse con las manifestaciones clínicas identificadas en los pacientes. El gen *IL9R* fue el primer gen identificado en la región pseudoautosómica de los cromosomas Xq y Yq. Está conformado por 11 exones y codifica una cadena alfa específica de ligando para el receptor heterodimérico. Este receptor se expresa por una variedad de células hematopoyéticas tales como células T, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos; pudiendo desempeñar un papel en el desarrollo del asma, y otras enfermedades alérgicas, como las que presentaban el 50% de los casos del estudio que no tenían malformaciones genitales. (Fatahi F; Kauppi P.) El gen *SPRY3*, está conformado por 2 exones y codifica para un miembro de la familia de proteínas SPROUTY (*SPRY*), el cual desarrolla un papel en la morfogénesis de la ramificación neuronal y se sugiere que puede inhibir la señalización del factor de crecimiento en el desarrollo neuronal y la ramificación de las células ganglionares durante el desarrollo postnatal y en el adulto. El papel que este gen pudiera tener en la clínica de estos pacientes es motivo de otro estudio (De Bonis; Ning Z.).

Una de las fortalezas encontradas en este estudio fue el abordaje para seleccionar la muestra, que fue desde los datos de laboratorio (biología molecular) a las manifestaciones clínicas, en forma inversa a lo que informaron Tannour-Louet et. al (manifestaciones clínicas - laboratorio), con porcentajes similares entre ambos estudios.

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

La dosis incrementada del gen *VAMP7* se encuentra asociada a trastornos de virilización, y probablemente a retraso del lenguaje y atopias.

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1 Formato de Historia Clínica

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA
HISTORIA CLÍNICA

F-GEC-12-00

FICHA DE IDENTIFICACION:

no. _____

Fecha: _____ No. de registro: _____
Nombre: _____
Edad: _____ Fecha Nacimiento: _____ Sexo: _____
Domicilio actual y tel: _____
Lugar origen: _____
Lugar donde radica actualmente: _____
Estado civil: _____ Escolaridad: _____
Ocupación: _____
Motivo de consulta: _____

ÁRBOL GENEALÓGICO:

- ☐ Consanguinidad
- ☐ Muertes infancia temp
- ☐ Muertes súbitas
- ☐ Abortos recurrentes
- ☐ Malf congénitas
- ☐ Sd cromosómicos
- ☐ Retraso mental
- ☐ Otro _____

Hoja 1 de 6

DATOS DEL PADRE:

Nombre: _____
 Lugar y fecha de nacimiento: _____ Edad al nacimiento del propósito: _____
 Ocupación: _____ Tiempo _____ Grupo sanguíneo: _____
 Toxicomanías: _____
 Escolaridad: _____
 Padece alguna enfermedad: _____ Medicamentos: _____
 I.V.S. A. _____ compañeros sexuales: _____ E.T.S. _____

DATOS DE LA MADRE:

Nombre: _____
 Lugar y fecha de nacimiento: _____ Edad al nacimiento del propósito: _____
 Edo. civil: _____ Grupo sanguíneo: _____ Escolaridad: _____
 Ocupación: _____
 Toxicomanías: _____
 Enfermedad: _____
 Medicamentos: _____
 Menarca, ritmo, duración y dolor: _____
 Método de planificación familiar (duración y tipo): _____
 I.V.S. A. _____ compañeros sexuales: _____ E.T.S. _____
 F.U.M. _____ G: _____ P: _____ A: _____ C: _____ cuál: _____

ANTECEDENTES PRE Y PERINATALES:

Control prenatal (inicio, lugar, tiempo): _____
 Intento de aborto: _____ A qué tiempo: _____ Método utilizado: _____
 Amenaza de aborto y/o parto prematuro (edad gestacional y síntomas): _____
 Inicio de movimientos fetales (tiempo, duración e intensidad): _____
 Enfermedades durante el embarazo y edad gestacional al que se diagnosticó:
☐ Diabetes Mellitus ☐ Epilepsia
☐ Hipertensión ☐ Enf. febril
☐ Patología Genética ☐ Otra _____
 Exposición a agentes físicos, biológicos o químicos (sustancia, semana en que ocurrió la exposición y tiempo):
☐ Alcohol ☐ Tabaco
☐ Drogas (alcohol, marihuana, cocaína)
☐ Productos naturistas
☐ Medicamentos
 Pruebas de diagnóstico prenatal (semana de gestación y hallazgo):
☐ Ultrasonido
☐ Prueba de tolerancia a la glucosa
☐ Marcadores séricos
☐ CVS/Amniocentesis/Cordocentesis
 Duración de la gestación: _____ Presentación del producto: _____
 Tipo de parto: _____ Operación cesárea (Indicación): _____
 Complicaciones: _____
 Tipo y tiempo de anestesia: _____
 Ruptura de membranas: _____ Líquido amniótico: _____ Placenta: _____

ANTECEDENTES NEONATALES:

Apgar: _____ Tipo de producto (único, múltiple) _____ Lloró al nacer: _____ Peso al nac: _____ Talla: _____ PC: _____
 Requirió manejo neonatal? Por qué? ¿Por cuánto tiempo? _____

☐ Alta conjunta con la madre

REFLEJOS PRIMARIOS

- | | |
|------------------------|----------------|
| 1.- Moro: | 2.- Preensión: |
| 3.- Búsqueda/succión: | 4.- Marcha: |
| 5.- Extensión cruzada: | 6.- Babinski: |

CRECIMIENTO Y DESARROLLO

- | | |
|---------------------------------|------------------------------|
| 1. Sostuvo la cabeza: | 2. Sonrisa social: |
| 3. Se gira sobre sí mismo: | 4. Se sentó sin ayuda: |
| 5. Gatea: | 6. Marchó sin ayuda: |
| 7. Inicia monosílabos y frases: | 8. Control de esfínteres: |
| 9. Dentición: | 10. Libido: |
| 11. Conducta social: | 12. Aprovechamiento escolar: |

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS Y NO PATOLÓGICOS

Alimentación:
 Inmunizaciones:
 Enfermedades congénitas:
 Enfermedades propias de la infancia:
 Hospitalizaciones previas (Qx, Tx)
 Alergias:
 Transfusiones:
 Intoxicaciones:
 Toxicomanías:

ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

Menarca, ritmo, duración y dolor:
 F.U.M. : I.V.S.A.: M.P.F.:
 G: P: A: C: Compañeros sexuales E.T.S.:

PADECIMIENTO ACTUAL**INTERROGATORIO POR APARATOS Y SISTEMAS**

Órganos de los sentidos:
 Cardiopulmonar:
 Vascular periférico
 Hemolinfático
 Endócrino
 Nervioso:
 Digestivo:
 Músculo-esquelético:
 Genito-Urinario:
 Psicológico

SOMATOMETRÍA:

Peso actual: _____ p: _____ Talla: _____ p: _____ Brazada: _____
 PC: _____ p: _____ PT: _____ p: _____ PA: _____ p: _____ SS: _____ SI: _____ Pie: _____

Habitus exterior:

- ☐ Normal
☐ Asténico

Piel y anexos:

- ☐ Estrías
☐ Hipopigmentación
☐ Hiperpigmentación

Cabeza y cabello:

- ☐ Cabello con textura anormal
☐ Remolinos anormales

Cara:

- ☐ Asimétrica
☐ Triangular

Cuello:

- ☐ Alado
☐ Otro

Ojos:

- ☐ Tamaño de fisuras
☐ Pliegues epicantales
☐ Hipo/Hipertelorismo
☐ Patrón anormal en iris

Narinas y Filtrum:

- ☐ Nariz pequeña/larga
☐ Puente nasal ancho
☐ Punta nasal bulbosa

Boca:

- ☐ Macrostomia/ Microstomia
☐ Labios delgados/gruesos
☐ Comisuras hacia abajo
☐ Labios en arco de cupido
☐ Boca en carpa

Orejas:

- ☐ Tamaño
☐ Microtia
☐ Otro

Tórax y glándula mamaria:

- ☐ Simétrico
☐ Pectus carinatum/excavatum
☐ Otro

Corazón:

- ☐ Pulsos normales

Abdomen:

- ☐ Diástasis de rectos

Extremidades:

- ☐ Desproporción talla/brazada
☐ Pulgar/1 orjejo ancho
☐ Polidactilia
☐ Ausencia de dedos
☐ Ectrodactilia

Columna vertebral:

- ☐ Marcador sacro
☐ Otro

Genitales:

- ☐ Femeninos normales
☐ Masculinos normales
☐ Tanner

Ano

- ☐ Implantación anormal

Neurológico:

- ☐ Reflejos Osteotendinosos
☐ Pares craneales
☐ Hipo/Hipertonía

- ☐ Obeso
☐ Marfanóide

- ☐ Hemangiomas
☐ Manchas café con leche
☐ Nevos

- ☐ Implantación baja/alta
☐ Fontanelas permeables

- ☐ Hipoplasia medio facial
☐ Redonda

- ☐ Pits/Fistulas

- ☐ Coloración de escleras
☐ Ptosis
☐ Distribución anl cejas/pestañas
☐ Colobomas

- ☐ Filtrum grado
☐ Columela corta
☐ Narinas antevertidas

- ☐ Macroglosia
☐ Labio hendido
☐ Paladar hendido
☐ Úvula bifida
☐ Ausencia de piezas dentales

- ☐ Malformada
☐ Implantación

- ☐ Pezones supranumerarios
☐ Teletelia

- ☐ Soplo

- ☐ Megalias

- ☐ Braquidactilia
☐ Clinodactilia
☐ Sindactilia
☐ Camptodactilia
☐ Aracnodactilia

- ☐ Escoliosis

- ☐ Hipospadias
☐ Testículos no descendidos
☐ Hipoplasia labios mayores/menores

- ☐ Atresia

- ☐ Parálisis
☐ Fuerza
☐ Coordinación

- ☐ Dismórfico
☐ Asimétrico

- ☐ Hiper elástica
☐ Cicatrices anormales

- ☐ Deformidad
☐ Craneosinostosis

- ☐ Tosca

- ☐ Corto/Largo

- ☐ Microftalmia
☐ Heterocromía
☐ Otro

- ☐ Punta nasal bifida
☐ Otro:

- ☐ Alteración del esmalte dental
☐ Micrognatia
☐ Retrognatia
☐ Prognatismo/Mandibula gde
☐ Otros

- ☐ Rotación
☐ Pits/Tags/Muecas

- ☐ Tanner _____
☐ Hipoplasia de músculos

- ☐ Ritmo

- ☐ Hernia umbilical

- ☐ Hiperlaxitud articular
☐ Dermatoglifos anormales
☐ Uñas hipoplásicas
☐ Contracturas
☐ Cubitus valgus

- ☐ Xifosis

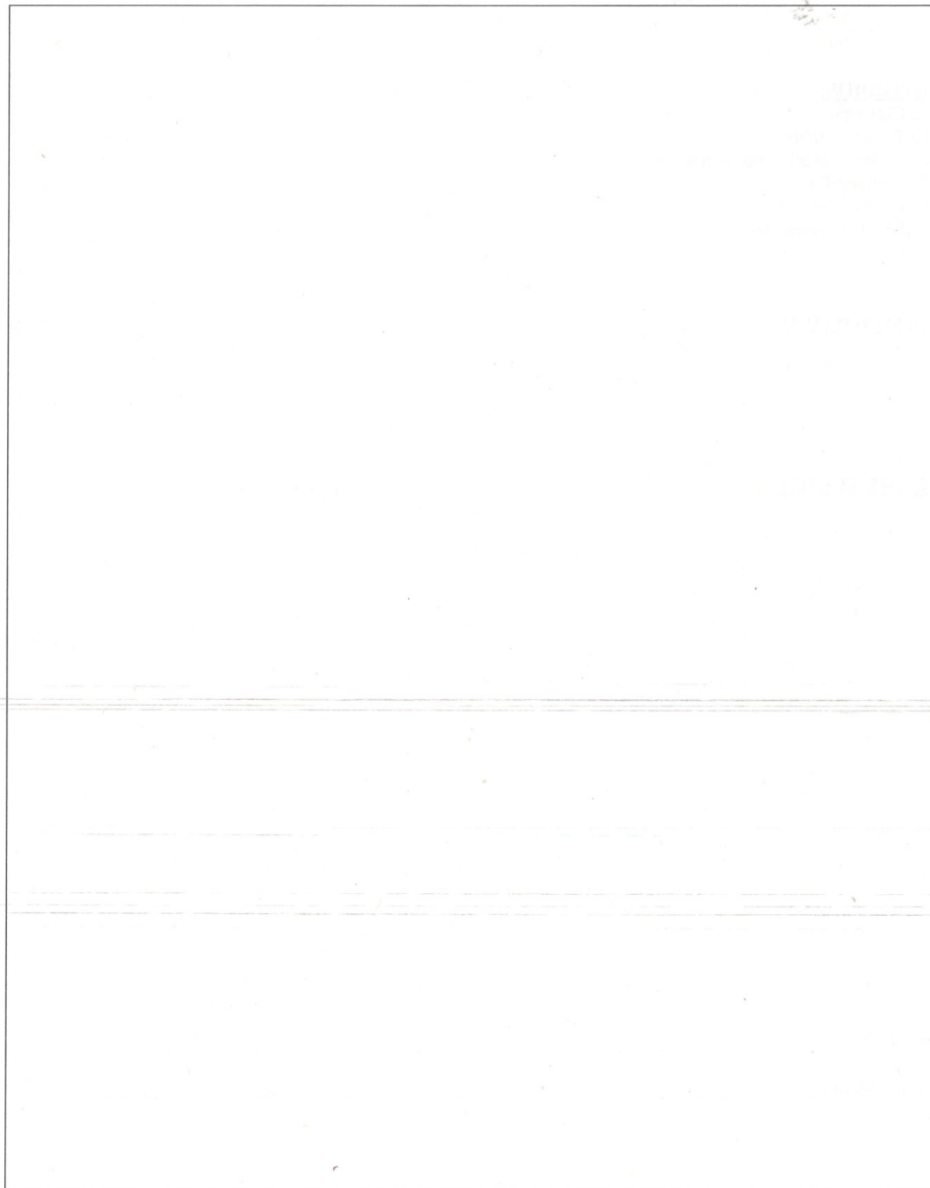
- ☐ Clitoromegalia
☐ Indiferenciados

- ☐ Fistulas

- ☐ Atrofia muscular
☐ Marcha



DESCRIPCIÓN:

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for a description. It occupies the central portion of the page, below the 'DESCRIPCIÓN:' label and above the footer. The box is currently blank, showing only the texture of the paper and some minor scanning artifacts.

INTERCONSULTAS:

ESTUDIOS:

- ☐ Cariotipo
- ☐ Tamiz metabólico
- ☐ Análisis de laboratorio general
- ☐ Radiografías
- ☐ Prueba molecular
- ☐ Estudios especiales
- ☐ Otro

DIAGNÓSTICO:**COMENTARIOS:**

Médico residente: _____

Médico responsable: _____

9.2 Carta de Aprobación por el Comité de Ética en Investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

DR. LUIS DANIEL CAMPOS ACEVEDO

Investigador principal
Departamento de Genética
Presente.-

Estimado Dr. Campos:

Le informo que nuestro **Comité de Ética en Investigación** del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez", ha **evaluado y aprobado** el proyecto de investigación titulado: **"Correlación clínica del incremento de la dosis génica de VAMP7 con alteraciones en la virilización"** el cual quedó registrado en esta Subdirección con la clave **GN17-00001**, participando además la Dra. Shadai Chávez Lopez, Dra. Marisol Ibarra Ramirez, QFB Jose Lugo Trampe y la Dra. Laura Elia Martinez Garza como Co-Investigador. De igual forma el siguiente documento:

- Protocolo escrito en extenso, versión 2.0 de fecha 30 de Mayo del 2017.

Le reitero que es su obligación presentar a este Comité de Ética en Investigación un informe técnico parcial a más tardar el día en que se cumpla el año de emisión de este oficio, así como notificar la conclusión del estudio.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior esté debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente,
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey N.L., 23 de Junio de 2017

DR. med. JOSE GERARDO GARZA LEAL
Presidente del Comité de Ética en Investigación

SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México
Teléfonos: (+52) 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874 Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



September 15, 2018

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA

Barthold JS, Gonzalez R. The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchidopexy. *J Urol*. 2003;170:2396-401.

Blanco S., Gottlieb S., Grinspon R., Rey R. Criptorquidia: desde la embriología al tratamiento *MÉD UIS*. 2015;28(3):371-80

Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS: Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation* 2012; 84: 261–268

Bouvattier C. Mircopénis *Archives de pédiatrie* 2014; 3650:1-5

Bouty A., Ayers K. L., Pask A., Heloury Y., Sinclair A.H. The Genetic and Environmental Factors Underlying Hypospadias. *Sex Dev* 2015; 9:239–259.

Campbell MF, Wein AJ, Kavoussi LR. Campbell-Walsh Urology. 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007.

Campos-Acevedo et. al. Dosage of Sex Chromosomal Genes in Blood Deposited on Filter Paper for Neonatal Screening of Sex Chromosome Aneuploidy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2016; 12:1-5

Carmichael SL, Shaw GM, Lammer EJ: Environmental and genetic contributors to hipospadias a review of the epidemiologic evidence. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012 94: 499–510.

Cirigliano V, Ejarque M, Fuster C, Adinolfi M. X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies. *Mol Hum Reprod*. 2002 Nov; 8(11):1042-5

Cunha GR, Sinclair A, Risbridger G, Hutson J, Baskin LS: Current understanding of hypospadias: relevance of animal models. *Nat Rev Urol* 2015 12: 271–280.

D’Esposito et. al. A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation. *Nat Genet.*1996; 13: 227-229.

De Bonis, M. L., et. al. Maintenance of X- and Y-inactivation of the pseudoautosomal (PAR2) gene SPRY3 is independent from DNA methylation and associated to multiple layers of epigenetic modifications. *Hum. Molec. Genet.* 15: 1123-1132, 2006.

Diagnóstico y Tratamiento de Hipospadias. México. Secretaría de Salud, 2010

Diagnóstico y tratamiento del testículo no descendido. México: Secretaría de Salud; 2014.

Fatahi F., et. al. Assessment of the Effects of *IL9*, *IL9R*, *IL17A*, and *IL17F* Gene Polymorphisms on Women with Allergic Rhinitis in Shahrekord, Iran *Ann Med Health Sci Res.* 2016 Jul-Aug; 6(4): 216–223.

J.L. Lechuga Campoy, A.M. Lechuga Sancho. Criptoquidia. *Protoc diagn ter pediatr.* (2011);1:1:34-43

Kauppi P., Laitinen T., Ollikainen V., Mannila H., Laitinen, L.A., Kere J. The *IL9R* region contribution in asthma is supported by genetic association in an isolated population. *European Journal of Human Genetics* (2000) 8, 788–792.

Klip H, Verloop J, van Gool JD, Koster META, Burger CW, et al: Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 2002 359: 1102–1107.

Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. *Advances in Molecular Genetics of Cryptorchidism. Urology.* 2009;74:571-8.

Lechuga Campoy J.L., Lechuga Sancho A.M.. Criptoquidia. *Protoc diagn ter pediatr.* (2011);1:1:34-43

Lund L, Engebjerg MC, Pedersen L, Ehrenstein V, Norgaard M, Sorensen HT: Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977–2005. *Eur Urol* 2009 55: 1022–1026.

Leung A.K., Robson W.L. Hypospadias: an update. *Asian J Androl* 2007 Jan; 9: 16-22

Martínez-Aedo M.J., Nieto Cuartero J.A, Prieto Veiga J.. Intersexo, Hispospadias, Micropene, Criptorquidia. *Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica*, Cap. 11:10-13.

Matarazzo et. al. Allelic inactivation of the pseudoautosomal gene SYBL1 is controlled by epigenetic mechanisms common to the X and Y chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No. 25 3191–3198

Matsushita S. et. al. Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development. *Nat. Rev. Urology* (2018)

Ning Z, McLellan AS, Ball M, Wynne F, O'Neill C, Mills W, Quinn JP, Kleinjan DA, Anney RJ, Carmody RJ, O'Keeffe G, Moore T. *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 15;24(18):5126-41

OMIM® and Online Mendelian Inheritance in Man® 1966-2016 Johns Hopkins University

Oski. Compendio de pediatría. 2da edición. Capítulo 38. Pág: 106-107

Pantoja BM, Kofi BE, Rio HG, Sánchez RO, Camué MR. Caracterización clinicoepidemiológica y terapéutica de pacientes con hipospadias. *MEDISAN* 2009; 13 (6)

Pérez NF, Llinás L.E. Manejo Hipospadias (En línea) 2004

Sagodi L, Kiss A, Kiss-Toth E, Barkai L: Prevalence and possible causes of hypospadias (in Hungarian). *Orv Hetil* 2014; 155: 978–985

Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993; 341:1392–1395.

Suzuki, H., Suzuki, K. & Yamada, G. Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters. *Dev. Growth Differ.* 57, 639–647 (2015).

Tannour-Louet et. al. Increased gene copy number of VAMP7 disrupts human male urogenital development through altered estrogen action. *Nat. Med.* 20, 715–724 (2014).

Tasian GE, CoppHL. Diagnostic performance of ultrasound in nonpalpable cryptorchidism: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 2011 Jan; 127(1):119-28

Tekgül S. ,et. al. Guía Clínica sobre Urología Pediátrica. *European Society for Paediatric Urology* (2009),14: 991,1002.

The GeneCards human gene database. Weizmann Institute of Science.

Vacca et al.: Alternative splicing of the human gene SYBL1 modulates protein domain architecture of longin VAMP7/TIVAMP, showing both non-SNARE and synaptobrevin-like isoforms. *BMC Molecular Biology* 2011 12:26.

Virtanem HE, Bjerknes R, Cortes D, Jorgensen N, Raipert de Meyts E et al. Cryptorchidism: classification, prevalence and long term consequences. *Acta Paediatrica*. 2007; 96:611-6.

Wang Z, Liu BC, Lin GT, Lin CS, Lue TF, et al: Up-regulation of estrogen responsive genes in hypospadias: microarray analysis. *J Urol* 2007 177: 1939–1946.

Watanabe M, Yoshida R, Ueoka K, Aoki K, Sasagawa I, et al: Haplotype analysis of the estrogen receptor 1 gene in male genital and reproductive abnormalities. *Hum Reprod* 2007 22: 1279–1284.

Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:620–631.

CAPÍTULO XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Shadaí Chávez López

Candidato para el Grado de Especialista en Genética Médica

Tesis: “CORRELACIÓN CLÍNICA DEL INCREMENTO DE LA DOSIS GÉNICA DE *VAMP7* CON ALTERACIONES EN LA VIRILIZACIÓN”

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Pachuca, Hidalgo el día 15 de Junio de 1990. Hija de Araceli López Beltrán y Alejandro Vargas Covarrubias. Actualmente residente de Monterrey, Nuevo León.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con el grado de Médica Cirujana en 2015.

Experiencia Profesional: Residente de Genética Médica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, de Marzo de 2016 a Febrero de 2019.